

# **VUOTAMATTOMIEN AIVOANEURYSMAPOTILAJEN BAKTEERILÖYDÖKSET IENTASKUISSA**

Jenni Hiltunen  
Syventävien opintojen kirjallinen työ  
Tampereen Yliopisto  
Lääketieteen ja biotieteiden tiedekunta  
Elokuu 2017

---

Tampereen Yliopisto  
Lääketieteen ja biotieteiden tiedekunta

JENNI HILTUNEN: VUOTAMATTOMIEN AIVOANEURYSMAPOTILAIEN  
BAKTEERILÖYDÖKSET IENTASKUISSA

Kirjallinen työ  
Ohjaajat: Tanja Pessi, Liisa Pyysalo

Elokuu 2017

Avainsanat: subaraknoidaalivuoto, suun infektiot, parodontiitti, qPCR

---

Tiivistelmä

Aneurysmat ovat aivovaltimon seinämien laajentumia. Aneurysman puhjetessa kuolleisuus lukinkalvonalaiseseen verenvuotoon (SAV) on jopa 50%. Riskitekijöistä tärkeimmät aneurysman muodostumiseen ja puhkeamiseen ovat nykytiedon mukaan korkea ikä, tupakointi, runsas alkoholin käyttö, verenpainetauti, ateroskleroosi sekä aiemmin sairastettu SAV. Tutkimustulosten mukaan tulehdus vaikuttaa aneurysmien muodostumiseen ja on jopa löydetty puhjenneista aneurysmista bakteeriDNA:ta.

Tässä tutkimuksessa määritimme vuotamattomien aivoaneurysmapotilaiden ientaskuista bakteeriDNA-määrät kvantitatiivisella reaaliaikaisella PCR-menetelmällä. Mittasimme viiden yleisimmän suun normaalibakteeristoon kuuluvan bakteeriDNA:n pitoisuudet (*Streptococcus mitis*-ryhmä, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*) ja näytteiden kokonaisbakteeripitoisuudet. Tutkimuksessa oli mukana yhteensä 64 potilasta, joilla oli todettu vuotamaton aivoaneurysma Tampereen yliopistollisessa sairaalassa ja 10 vapaaehtoista verrokia valittiin sairaalan henkilökunnasta mukaan tutkimukseen. Hampaiden kunto tarkastettiin ja ientaskujen syvyys tutkittiin kaikilta potilailta sekä hampaat kuvannettiin kaikilta potilailta sairaalaantulovaiheessa.

Tuloksena saatiin tilastollisesti merkittäviä eroja naisten ja miesten välisissä bakteeripitoisuuksissa; kokonaisbakteerien ( $p=0,037$ ) ja streptokokkien ( $p=0,049$ ) määrät olivat korkeammat miehillä kuin naisilla. Hampaiden harjauskerrat myös vaikuttavat *Fusobacterium*-bakteeripitoisuuksiin vähentävästi ientaskuissa ( $p=0,038$ ). Lisäksi huomasimme, että hammasinfektioita kuvaava parametri ientaskujen syvyys assosioitui *Fusobacterium* -bakteeripitoisuuteen siten, että logaritminen *Fusobacterium*-pitoisuus oli tilastollisesti merkittävästi suurempi niillä potilailla, joilla oli yli 4-5 mm ientasku ( $p=0,001$ ) verrattuna niihin, joilla oli pienemmät ientaskut. Myös potilailla, joilla oli yli 6 mm:n ientasku, oli tilastollisesti suuremmat logaritmiset *Fusobacterium*-pitoisuudet verrattuna potilaisiin, joilla oli pienemmät ientaskut ( $p=0,001$ ). Näiden tutkimustulosten valossa suun infektiot saattavat liittyä aneurysmien etiologiaan.

<b>1 JOHDANTO</b>	<b>4</b>
1.1 Aivoaneurysmat	4
1.2 Epidemiologia	4
1.3 Riskitekijät	5
1.4 Aivoaltimoaneurysmien komplikaatiot	5
1.5 Kliininen kuva ja hoito	6
1.6 Histopatologia	8
1.7 Etiologia	9
1.8 Suun bakteerit	10
1.9 Ientaskut ja suun tulehdukset	12
1.10 Tutkimuksen tavoite	14
<b>2 AINEISTO JA MENETELMÄT</b>	<b>15</b>
2.1 Tutkimuksen potilaat ja näytteiden otto	15
2.2 BakteeriDNA:n eristys	16
2.3 Tutkimuksen DNA-pitoisuusmittaukset spektrofotometrillä	16
2.4 BakteeriDNA:n määrittäminen qPCR:n avulla	16
2.5 Tiedonkäsittely	18
<b>3 TULOKSET</b>	<b>19</b>
3.1 Arviointi	17
<b>4 POHDINTA</b>	<b>23</b>
<b>5 LÄHTEET</b>	<b>25</b>

# 1 JOHDANTO

## 1.1 Aivoaneurysmat

Aivovaltimopullistuma eli aneurysma on aivovaltimon seinämän laajentuma. Aneurysma on useimmiten muodoltaan säkkimäinen (sakkulaarinen) ja sijaitsee aivovaltimon toisessa reunassa ja usein suurten aivovaltimoiden haaraumissa circulus Willisiin lähellä, lukinkalvon alaisessa tilassa heti aivojen alapuolella. (J. Jääskeläinen 2016)

Sukkulanmuotoiset eli fusiformiset aivoaneurysmat ovat seurausta lähes poikkeuksetta ateroskleroosista. Tyyppipaikat fusiformisille aneurysmille ovat kallonpohjavaltimossa (a. basilaris) ja sisemmässä kaulavaltimossa (a. carotis internassa). (S. Roine et al. 2012)

Aneurysmia on todettu keskimmäisen aivovaltimon (a. cerebri media) haaraumassa, etummaisen yhdysvaltimossa (a. communicans anterior) ja sisemmässä kaulavaltimossa (a. carotis interna); takakierron alueella aneurysmilla on todettu suurempi riski puhkeamiseen (N Engl J Med 1998, G. Rinkel 2016). Aneurysman vuoto tapahtuu yleensä subaraknoidaalitilaan, sillä aneurysma sijaitsee aivojen pinnalla likvortilassa.

## 1.2 Epidemiologia

2-3 %:lla on arvioitu esiintyvän aivovaltimoaneurysma monissa väestöissä oireettomana, sillä valtaosa aneurysmista ei tule ilmi pienen kokonsa ja oireettomuuden vuoksi. Vuotamattomia aneurysmia on arviolta noin 100 000:lla henkilöllä suomalaisväestössä, joista noin sadas osa puhkeaa vuodessa. Riski aneurysmaattiseen SAVin on kuitenkin muuhun maailmaan verrattuna suuri, jopa yli kaksi kertaa yleisempi kuin muualla maailmassa. Lukinkalvonalaiseen verenvuotoon kuolee vuosittain noin 500 ihmistä ja SAV:sta erilaisissa tiloissa toipuvia on myös n. 500. (J. Jääskeläinen 2016, R. Tulamo 2011). Kuitenkin 90 - 95% potilaista saadaan diagnosoitua tietokonetomografiatutkimuksen

avulla (D. Liebeskind 2016). SAVn sairastuneista noin 25-50% potilaista menehtyy ja noin 50% selvinneistä vammautuu pysyvästi tapahtumasta (Wardlaw JM, White PM 2000). Potilaista osan on myös todettu parantuvan täysin. Lisäksi leikkaustoimenpiteillä voidaan vaikuttaa tilan uusiutumiseen (P. Mustajoki 2015).

### **1.3 Riskitekijät**

SAV:iin sairastuvilla potilailla on yhdistäviä tekijöitä, tila kohdistuu yleensä työikäisiin, ilmaantuvuus on lisääntynyt erityisesti 45-70-ikävuosina (M. Korja 2013), lisäksi aneurysmat ovat yhdistetty tulehdukselliseen prosessiin (M. Pyysalo 2013). Aneurysman synnyn ja puhkeamisen riskitekijöitä ovat tupakointi, runsas alkoholin käyttö sekä verenpainetauti. Myös iällä, ateroskleroosilla ja aiemmalla SAVilla näyttäisi olevan korrelaatio esiintyvyyteen. Synnynnäisiä riskitekijöitä ovat geneettiset tekijät, kuten jotkin harvinaiset periytyvät sidekudossairaus (Seong-Ho Park 2008, D Mohan 2015), mutta niillä näyttäisi olevan pienempi rooli kuin ympäristötekijöillä lukinkalvonalaisen vuodon etiologiaa selittävänä tekijänä (M. Korja 2010), lisäksi naissukupuoli ja polykystinen munuaistauti ovat riskitekijöitä (R. Tulamo 2011).

### **1.4 Aivovaltimoaneurysmien komplikaatiot**

Sakkulaarisiin aneurysmiin kertyy herkästi trombimassaa, sillä verenvirtaus niissä on pyörteistä (S. Omodaka 2012) ja vähäisempää, lisäksi heikko suonen seinämä voi dissekoitua, jolloin valtimon suonen seinämän intima repeää ja veri pääsee median kerrosten väliin. (R. Tulamo 2011) Aivovaltimoaneurysman suurin riski on sen puhkeaminen ja veren vuotaminen likvortilaan lukinkalvon alle aiheuttaen lukinkalvonalaisen verenvuodon eli subaraknoidaalivuodon (SAV). (S. Roine 2012) Suurin taustatekijä lukinkalvoalaisten vuotojen aiheuttajana onkin sakkulaarisen aneurysman puhkeaminen. (R. Roine 2015) Muita harvinaisempia syitä ovat arterio-venoosi-

malformaation tai muun verisuoniepämuodostuman vuoto, spinaalinen SAV, intrakraniaalinen dissekoituma, vaskuliitti ja hypertensiivinen enkefalopatia. (J. Jääskeläinen 2016, R. Roine 2015) Viidelletoista prosentille primaarisista SAV-tapauksista ei voida neuroradiologisesti osoittaa syytä, jolloin tehdään lisäkuvantamisia ja lisätutkimuksia (J. Jääskeläinen 2016). Spontaanissa aivoverenvuodossa veri voi myös levitä likvortilaan. Tulee ottaa huomioon, että likvor voi olla veristä lievänkin aivoruhjeen tai lääkityksen vuoksi muun muassa liittyen antikoagulanttien käyttöön tai toimenpiteeseen kuten lannepistoon. (J. Jääskeläinen 2016)

Aneurysmien diagnosointi on haastavaa erityisesti akuuteissa tapauksissa, jolloin potilaan tila vaatii välitöntä hoitoa. SAV on hengenvaarallinen tauti, koska vuoto voi levitä aivokudokseen, potilas voi saada akuutin aivo-selkäydinnestekierron häiriön (hydrokefaluksen), kallonsisäinen paine voi nousta ja aivokudos voi kärsiä hapenpuutteesta eli mennä iskeemiseksi ja näistä voi seurata laaja-alainen aivovaurio ja menehtyminen. SAV voi myös vaikuttaa pitemmällä aikavälillä, sillä on mahdollista, että syntyy iskeeminen vaurio aivovaltimospasmi-mekanismilla, tai pitkän ajan kuluessa voi kehittyä kommunikoiva hydrokefalus -tila. Myös epilepsia voi kehittyä aivokudoksen vaurion seurauksena.

Ensimmäisestä vuodosta selvinnyt on suuressa riskissä saada uusi vuoto verisuonen pinnan heikkouden takia puhjenneessa kohdassa. Sen vuoksi vuotanut aneurysma pyritään hoitamaan päivystyksellisesti. (J. Jääskeläinen 2016) Aneurysman puhkeamista ei osata arvioida, eivätkä kaikki puhkeakaan (R. Tulamo 2011).

## **1.5 Kliininen kuva ja hoito**

Puhkeamaton aivoaneurysma voi laajetessaan aiheuttaa neurologisia oireita, jolloin se ilmenee aivohermo-oireena ( II, III) hemipareesin, obstruktiivisen hydrokefaluksen tai

eplepsian muodossa (N. Ajiboye, 2015). Puhjenneen aivoaneurysman aiheuttaman subaraknoidaalivuodon oireita ovat äkillisesti alkava äärimmäisen kova ja laantumaton päänsärky, johon liittyy usein pahoinvointia, oksentelua, niskajäykkyyttä ja silmien valonarkuutta. Potilas voi kouristella, mennä tajuttomaksi ja myös halvausoireita voi esiintyä, lisäksi lievemmissä tapauksissa esiintyy puhevaikeutta ja kaksoiskuvia. Oireet vaihtelevat potilaskohtaisesti voimakkuudeltaan ja oirekirjoltaan. (J.Jääskeläinen 2016)

Vuoto kestää usein vain sekunteja, mutta likvorkiertoon päässyt veri ärsyttää aivokalvoja, jonka takia kipu kestää useammankin viikon. (J.Jääskeläinen 2016) Ensivussa huomioon otettavia erotusdiagnostisia vaihtoehtoja ovat muun muassa migreeni ja aivoinfarkti; diagnoosin haastavuuden takia lieväoireinen SAV saattaakin jäädä diagnosoimatta. (R.Roine 2015 J.Jääskeläinen 2016), Tutkittaessa SAVia käytetään ensisijaisesti pään tietokonetomografiaa (TT) ja likvortutkimusta tarvittaessa diagnostisina apuvälineinä. Tulevaisuudessa aneurysmien seulontaa, diagnostiikkaa ja hoitoa helpottaisi mahdollisesti aneurysmissa sijaitsevan tulehduksen kuvantaminen ja täsmällinen lääkehoito sekä biologian selvittäminen. (R. Tulamo 2011)

SAV diagnosoidaan päivystysluontoisesti TT:llä ja aneurysman olemassaolo varmennetaan saman tien aivovaltimoiden TT-angiografialla (TTA) tai katetriangiografialla (digitaalinen subtraktioangiografia, DSA). SAV-potilaan hoito toteutetaan yliopistosairaalassa. (J.Jääskeläinen 2016) Akuuttiin SAViin voi liittyä myös muiden elinten vakavia häiriöitä, kuten hormoni- ja mineraalitasapainon häiriöitä sekä sydän- ja keuhko-ongelmia (S Chen 2014).

Vuotanut aneurysma suljetaan akuuttivaiheessa joko mikrokirurgisesti jousipuristimella (klipsillä) tai suonensisäisesti (endovaskulaarisesti) platinakierukoilla (koileilla), joskus stentillä avustettuna (N Ajiboye 2015).

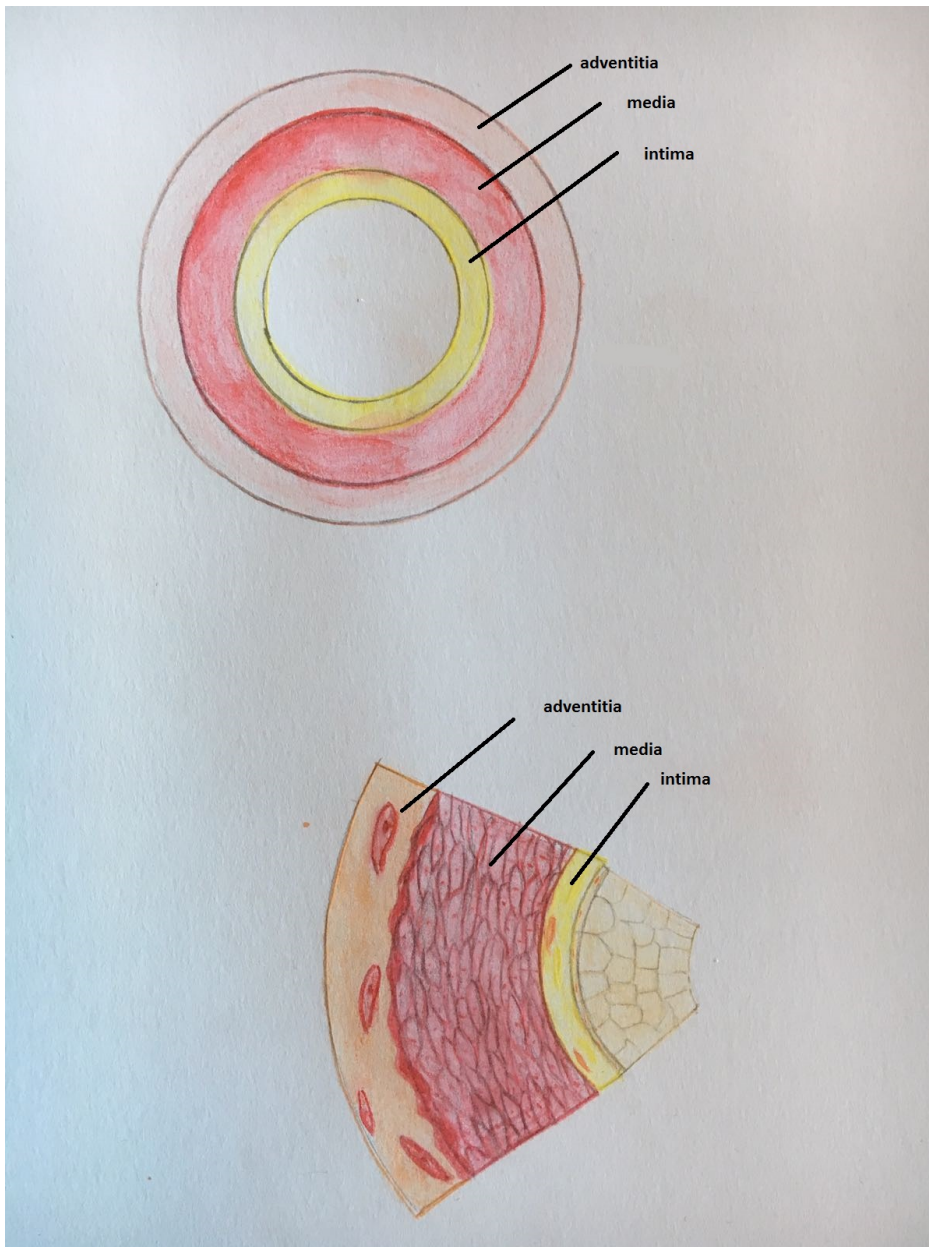
Vuotamattomia aneurysmia on arvioitu olevan noin kolmella sadasta (N Etminan 2016). Vuotamattomat aneurysmat ovat yleensä oireettomia. Osa löydetään aiemman SAVin vuoksi potilailla, joilla on useita aneurysmia. Pieni osa löydetään aneurysman aiheuttaman oireen perusteella (muun muassa embolia aneurysmasta, hydrokefalus, aivohermo-oire). Lisäksi osa löytyy sattumalta muusta syystä tehdyn pään TT:n tai magneettikuvauksen avulla. (N Ajiboye 2015)

## 1.6 Histopatologia

Valtimoseinämän rakenne koostuu kolmesta kerroksesta, joista sisimpänä on *tunica intima*, keskimmäisenä *tunica media* ja uloimpana *tunica adventitia*. *Tunica intima* koostuu kolmesta eri komponentista: yksinkertaisesta levyepiteelistä eli *endoteelistä*, kollageenisäikeistä, proteoglykaaneista ja glykoproteiineista muodostuvasta *basaali laminasta* sekä löyhästä sidekudoksesta muodostuvasta *subendotelialisesta kerroksesta*, jossa on mukana myös elastista materiaalia ja satunnaisia sileälihassoluja. *Tunica media* eli seinämän keskikerros on paksu erityisesti valtimoissa ja se koostuu pääasiassa kehämaisesti asettuneista sileälihassoluista. Sileälihassolujen väliin on asettunut elastaania, retikulaarisäikeitä ja proteoglykaaneja. Ulompi elastinen kerros erottaa *tunica median* ja *tunica adventitian*. *Tunica adventitia* koostuu pitkittäissuuntaan asettuneesta kollageeni kudoksesta, jossa on mukana elastisia säikeitä. *Tunica adventitiassa* on myös valtimoita itseään ruokkivia *vasa vasorum* –verisuonia ja niitä hermottavia *nervi vascularis* –verkostoja, jotka antavat seinämän sileille lihaksille supistumiskäskyn. (M. Ross 2010 )

Valtimoita voidaan jakaa koon ja erilaisen rakenteen mukaan: suurimmat valtimot ovat elastisia, nämä jakautuvat pienemmiksi lihasvaltimoiksi, joidenka kyky supistua on parempi kuin suurten elastisten valtimoiden. Lihasvaltimot jakaantuvat vielä pienemmiksi arterioleiksi, joilla on tärkein verenpainetta säätelevä ominaisuus ja tällä tasolla ravinteiden vaihto tapahtuu veren ja kudosten välillä. Näissä on endoteelikerros sekä yksi tai kaksi lihassolukerrosta. (M. Mäkinen 2012)





Kuva 1. Valtimon seinämän kerrokset: sisäkerros eli tunica intima, keskikerros eli tunica media ja uloin kerros eli tunica adventitia.

## 1.7 Etiologia

Aneurysman puhkeamismekanismi on toistaiseksi tuntematon, mutta sen on osoitettu olevan yhteydessä krooniseen tulehdusreaktioon, johon liittyy seinämän rappeutuminen ja tekee siten suonon seinämästä heikomman ja näin vuotoalttiin. Tulehdus kudoksessa voi johtaa endoteelin toiminnan huononemiseen ja tulehduksellisen vasteen kautta

vaskulaarisen sileän lihassyyn fenotyyppiseen modulaatioon tuottamalla tulehdusta edistäviä eli pro-inflammatorisia tekijöitä ja aktivoimalla tulehdussoluja. Vuotamattomissa aneurysmissa valtimon seinämän intimaa suojaa myointimaalinen hyperplasia ja organisoituneet verihiutaleet, kun taas puhjenneissa aneurysmissa solut ovat vahingoittuneet. On myös tutkittu, että solussa olevat signaalintitiet, kuten apoptoosi, soluproliferaatio, stressi-tapahtuman signaali eroavat vuotaneilla ja vuotamattomilla aneurysmilla ja tällä löytyy yhteys myös aneurysman geometriseen rakenteeseen. Myös aneurysman koko, muoto ja paikka sekä oksidatiivinen stressi lisäävät aneurysman seinämän heikkenemistä ja siten puhkeamista. (N. Chalouhi 2012) Histologisesti vuotaneissa aneurysmissa ei ole sileälihassoluja seinämissä, joka on seurausta inflammaatiosta (J Frösen 2014).

Uusimpien tutkimustulosten mukaan tulehduksen takana saattaisi olla aivoaneurysmaan päässeet suun bakteerit tai niiden osat (Pyysalo ym 2013, Pyysalo ym 2016 ). Iwai T. ja kollegat arvioivat artikkelissaan, että lymfasuonten aukot sitovat bakteereita matkalla suusta verenkiertoon ja kantaa niitä verisuonten kulmakohtiin, jolloin ientulehdusta ja parodontiittia aiheuttava bakteeri *P. gingivalis* aktivoi verihiutaleita ja saa ne kasaantumaan. Samaan aikaan vapautuu myös proinflammatorisia sytokiineja ja serotoniinia. Lisäksi aneurysman muodostumiseen vaikuttavat verenvirtauksesta aiheutuva stressi kudokseen, johon vaikuttavat virtauskulma ja suonien rakenneominaisuudet, kuten rakenneproteiinien geneettinen expressio ja kasvua säätelevät tekijät (N Chalouhi 2012, K Türker 2005) sekä suonien geometria (Dhar et al.).

## **1.8 Suun bakteerit**

Suussa elää hyvin monimuotoinen ja ainutlaatuinen bakteeristo; suussa on satoja erilaisia bakteerilajeja sekä aerobisia että anaerobisia lajeja. Patogeenisiä eli potentiaaleja taudin aiheuttajia- bakteereita on sitä enemmän mitä huonompi suuhygienia on. (B. Pihlstrom 2005) Yleisimpiä suun bakteereita koko suun alueella ovat *Gemella*, *Granulicatella*,

*Streptococcus* ja *Veillonella* terveessä suussa (J. Aas 2005). Kaikilla ihmisillä suun bakteerikanta vaihtelee, myös suun erilaisten kudosten välillä on vaihtelua bakteerikannassa kullekin bakteerille parhaaksi sopivaan ekolokeroon asettumalla. (B. Pihlstrom 2005) Suussa voi olla myös muiden lähekkäisen elimien kudoksien bakteereita, esimerkiksi ylähengitystieinfektioiden bakteereita, suolen normaaliflooraa ja ihon bakteereita (F. Dewhirst 2010). Suun bakteereita löytyy myös muualta ruuansulatuskanavasta ja hengitysteistä (E. Pennisi 2005).

Ihmisen suu kolonisoituu eri bakteereilla jo synnytyksen yhteydessä äidin synnytyskanavan mikrobistolla (Dominguez-Bello MG 2010). Tutkimusten mukaan imeväisikäisen suun kolonisoivat hetimiten todennäköisimmin anaerobiset bakteerit. (E. Könönen 1992) Ensimmäisenä vastasyntyneen suun limakalvolle kiinnittyy bakteereita, joista yleisimpiä on *Prevotella (Bacteroides) melaninogenica*, *Fusobacterium nucleatum*, *Veillonella spp.* ja *nonpigmented Prevotella (Bacteroides) spp.*, patogeenisistä bakteereista *Bacteroides gracilis*, *Wolinella spp* ja *Eikenella corrodens* todettiin myös pienellä osalla vastasyntyneistä. Lisäksi *Leptotrichia spp*, *Capnocytophaga spp*, *Prevotella (Bacteriosides) loescheii* ja *Prevotella (bacteriosides) intermedia* bakteereita todettiin pienellä osalla. (E. Könönen 1992) Hampaiden kolonisaatio on todettu tapahtuvan tietyssä järjestyksessä ammattilaisen suorittaman puhdistuksen jälkeen, pinnalle kiinnittyy ensimmäiseksi ns. Early colonizer –bakteereita, joista suurin osa (60-90%) koostuu streptokokeista, muita samanaikaisesti kolonisoivia bakteereita ovat *Actinomyces spp.*, *Capnocytophaga spp.*, *Eikenella spp.*, *Haemophilus spp.*, *Prevotella spp.*, *Propionibacterium spp.* ja *Veillonella spp* (P. Kolenbrander 2002). Early colonizer -bakteereiden muodostamalle biofilmille kiinnittyy ns. 'middle colonizer'-bakteerit, joihin kuuluu *Fusobacterium nucleatum* ja *Porphyromonas gingivalis* ja 'late colonizer' –bakteerit, joihin puolestaan kuuluu *Streptococcus mutans* ja *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (S. Periasamy 2010). Kun hampaat puhkeavat, syntyy suun bakteereille uusia kiinnittymispintoja. Hampaan pinta on erinomainen paikka bakteereiden tarttumiseen, sillä hampaat ovat suussa pysyviä ja se muodostaa hilseilemättömän pinnan. Nämä asiat auttavat biofilmin nopeaan muodostumiseen. Iän mukana bakteerikanta suussa vaihtelee: noin kolmen kuukauden iässä imeväisten yleisimmät bakteerit ovat *Prevotella melaninogenica*, *Fusobacterium nucleatum*, *Veillonella spp.*, ja non-pigmented *Prevotella spp*. Seurannassa samoja imeväisiä tutkittiin heidän

hampaiden puhkeamisen aikaan ja tällöin saatiin eristetyksi enemmän hampaan tukikudossairauksia eli parodontaalisairauksia aiheuttavia bakteereita (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Cambylobacter rectus* ja *Prevotella intermedia*) lisäksi kariksen aiheuttajia (*Streptococcus mutans*). (P. Marsh 2000, J. Cortelli 2008, P. Marsh 2000)

## 1.9 Ientaskut ja suun tulehdukset

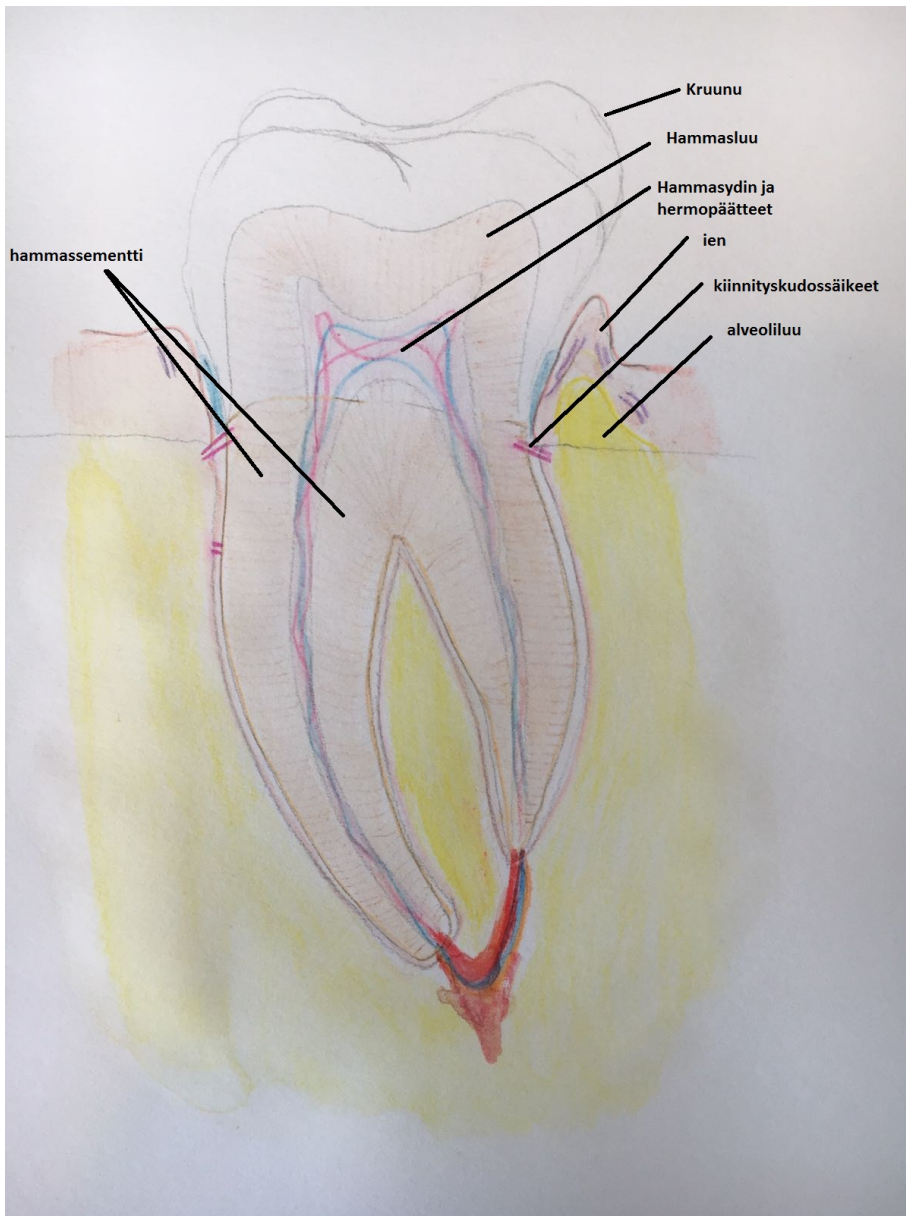
Karies ja parodontiitti ovat tavallisia suun tulehdussairauksia, jopa 90%lla ihmisistä voi esiintyä niitä maailmanlaajuisesti (B. Pihlstrom 2005). Syvien kaulan alueen infektioiden yleisin syy on hammasperäiset infektiot. Muiden sairauksien komplisoidessa niitä tarvitsevat infektiot pitkää sairaalahoitoa. (T. Huang 2004)

Suun infektiosairauksien edetessä bakteerien määrä lisääntyy ja inflammaatio leviää hampaantukikudokseen ja johtaa hammasta tukevan sidekudoksen ja luun menetykseen. Tämä johtaa lopulta muodostuviin ientaskuihin ja rakoihin ikenen ja hammasjuurten välillä. Vakava-asteinen ientulehdus voi aiheuttaa hampaiden heilumista, ajoittaista kipua, purentaongelmia ja hampaiden irtoamista. (B. Pihlstrom 2005)

Ientulehduksen ja parodontiitin raja on häilyvä, pidemmälle kudokseen ulottuvassa tulehduksessa kuitenkin anaerobisten bakteerien osuus kasvaa. Tulehtuneesta tukikudoksesta bakteerit voivat levitä myös syvempiin kudoksiin ja parodontaalisairauksissa on todettu suurentuneita veren pitoisuuksia C-reaktiivista proteiinia, fibrinogeeniä ja sytokiineja, jotka on yhdistetty atheroskleroottiseen sairauteen. Myös *in-vitro* -kokeissa ja eläinkokeissa on saatu viitteitä siitä, että parodontaalibakteerit aktivoivat verihiutaleiden tarttumista ja saavat aikaan vaahtosolujen muodostumista. Parodontaalipatogeneja on myös löydetty carotis endarterektomiassa eli valtimon sisäkalvon ja sen alaisen plakin poistossa. (B. Pihlstrom 2005) Parodontiitin yleisimpiä aiheuttajia ovat *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, joka liittyy nuorempien

parodontiittiin, aikuisuudessa taas *Porphyromonas gingivalis* on yleisin aiheuttaja. Parodontiittiin liittyy usein myös seuraavat anaerobiset bakteerit: *Tannerella forsythia*, *Eikenella corrodens*, *Campylobakter rectus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Micromonas micros* (nykyisin *Parvimonas micra*), *Treponema denticola* ja *Prevotella intermedia*-ryhmän bakteerit. On todettu, että ientaskun syvyydellä ja BOP-prosentilla (bleeding on probing – prosentilla) on positiivinen korrelaatio parodontiitin etiologisten bakteereiden kanssa. (E. Könonen 2016)

Elimistön yksi suojautumiskeino mikrobeita vastaan on sylki, jonka puolustuskeinot ovat sekä spesifisiä että epäspesifisiä mikrobeita vastaan. Tärkein on IgA-ryhmän molekyylit, lisäksi sylki sisältää IgG- ja IgM-luokan vasta-aineita, lysotsyymiä, laktoferriiniä ja bakteereiden toimintaa rajoittaa bakteriostaattinen peroksidaasijärjestelmä. (Pöllänen M 2003)



Kuva 2. Hampaan ja kiinnityskudosten rakenne.

## 1.10 Tutkimuksen tavoite

Tutkimuksen tavoitteena on selvittää, kuinka paljon yleisimpiä periodontaalibakteereita ja suun normaalimikrobistoon kuuluvia bakteereita löytyy SAV-potilaiden ja terveiden kontrollien ientaskuista ja liittyykö niiden määrä ientaskujen suurentumiseen ja muihin suussa kliinisesti mitattaviin suureisiin.

## **2 AINEISTO JA MENETELMÄT**

### **2.1 Tutkimuksen potilaat ja näytteiden otto**

Tutkimukseen otettiin mukaan syyskuun 2012 ja joulukuun 2014 välisenä aikana 64 potilasta, joilla hoidettiin vuotamaton aneurysma Tampereen yliopistollisessa sairaalassa. Kriteereinä olivat seuraavat: potilas, jolla oli sakkulaarinen aneurysma, 18-99 –vuotias, potilas pystyi itse antamaan suostumuksen tutkimukseen ja potilaan tila oli tarpeeksi vakaa kuljetettavaksi radiologiselle osastolle sairaalan sisällä. Poissulkukriteereinä olivat potilaan tila, joka vaati teho-hoitoa ja potilaat, jotka eivät voineet antaa suostumustaan tutkimukseen. Tutkimuksen potilasaineistoksi lopulta otettiin mukaan 64 potilasta. Potilailta selvitettiin ikä, sukupuoli, tupakointi. Erikoishammaslääkäri teki potilaille sairaalaan tulovaiheessa kliinisen hammastutkimuksen, jossa selvitettiin periapikaalileesiä, kystat, ientaskujen syvyys, lisäksi otettiin hampaiden panoraamatomografia ja hampaiden kartiokeilatogramafia. Hampaiden tulehdusaste arvioitiin Mattilan menetelmällä (BMJ;298;1998;779-781) pisteyttämällä 0:sta 10:een pisteiden noustessa infektiokuorman kasvaessa. Potilaiden ientaskunäytteet otettiin syvimmästä suun ientaskusta käyttäen apuna steriiliä imupaperia (Pearl Dent Co, Ho Chi Minh City, Vietnam). Imupaperi laitettiin eppendorf-putkeen, jossa oli 200 µl RNA ja DNA –vapaata vettä ja näytteet säilöttiin -20 °C, kunnes ne analysoitiin.

Lisäksi tutkimuksessa oli mukana kymmenen vapaaehtoisin, sairaalan henkilökuntaan kuuluvan kontrollipotilaan ientaskunäytettä, joilta on tiedossa ikä, sukupuoli ja tupakoinnin määrä. Heiltä otettiin ientaskunäytteet samalla menetelmällä.

## 2.2 BakteeriDNA:n eristys

Ientaskunäytteistä eristettiin DNA QIAmp tissue bacteria Protocol – menetelmää käyttäen (Qiagen ltd, California, USA). Näytteeseen pipetoitiin 20 mikrolitraa kitissä olevaa Prot. K:ta ja 180 ul Buffer ATL:ta ja inkuboitiin +56 C asteessa 1 tunnin ajan. Sen jälkeen lisättiin Bufferia (AL:ää). DNAn presipitaatio tehtiin käyttäen etanolia 200 mikrolitraa. Lisäysten välissä vortexoitiin, inkuboitiin ja spinnattiin protokollan mukaisesti. Näin saatiin nestemäinen 60ul:n ientaskunäyte. Näytteet varastoitiin -20 °C:ssa pakastimessa. Samaa menetelmää käytettiin sekä potilaiden näytteille että kontrollien näytteille, eristäen näytteet kolmessa eri erässä lisäksi kontrollit yhdessä erässä.

## 2.3 Tutkimuksen DNA-pitoisuusmittaukset spektrofotometrillä

Näytteiden kokonaisDNA-pitoisuus mitattiin Nanodrop-spektrofotometrillä. Mittauksessa mittatilavuutena käytettiin 1 mikrolitraa kullekin näytteelle, joka pipetoitiin spektrofotometrin pedestaalille. Laite mittasi näkyvän valon ja ultraviolettialueiden sähkömagneettista säteilyä, josta saatiin laskettua näytteen DNA-pitoisuus.

## 2.4 BakteeriDNA:n määrittäminen qPCR:n avulla

Tutkimuksessa määritettiin *Streptococcus mitis*-ryhmän bakteerien, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*,



*Porphyromonas gingivalis*in sekä kokonaisbakteerien määrät käyttämällä spesifisiä alukkeita ja koettimia. Mittauksissa käytettiin AbiPrism 7900 HT Sequence Detection System –laitetta (TaqMan, Applied Biosystems, California, USA). Ensin kullekin bakteerille tehtiin standardisuora, jota varten laimennettiin tunnetun pitoisuuden näytteitä laimennussarjaksi. Referenssibakteereina käytettiin ATCC-tietokannan bakteereita: *Streptococcus mitis* ATCC 49456, *Prevotella intermedia* ATCC25611, *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC 25586, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 700685, *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, *E. coli* strain ATCC 25922. Laimennussarjan avulla määritettiin kullekin bakteerille PCR-kulmakerroin ja vakio. Kaavasta  $Ct = -\text{kulmakerroin} \cdot \log(x) + \text{vakio}$  saatiin laskettua kokonaismäärät ratkaisemalla yhtälöstä x.

Reaktioliuoksen tilavuus yhdessä kuopassa oli 20 ul, johon sisältyi 3,00 ul tislattua vettä, 10,00 ul Master Mix Enviromental Master Mixiä, 2,00 ul aluke (F) –liuosta, 2,00 ul aluke (R)-liuosta, 2,00 ul koetin (P1) –liuosta, sekä eristettyä DNA-liuosta 1,00 ul. Alukkeiden ja koettimien pitoisuuksia optimoitiin, jotta PCR toimisi optimaalisesti. Kriittinen kynnys, eli critical threshold (Ct) ilmaisee PCR syklien määrän, jolloin fluoresenssilla leimatusta koetimesta vapautunut fluoresenssi ylittää kynnysarvon 0,2; ja on kääntäen verrannollinen näytteissä olevaan DNA:n määrään. Näin ollen kynnysluvun ollessa alhainen, on näytteen DNA-pitoisuus suuri. Koeajojen avulla saatiin seuraavat suhteet reagensseille (laimennettaessa käytettiin DNAaase, RNAaasi vapaata Trispuiskuria):

Bakteeri	aluke (F)	aluke (R)	koetin(P1)
AA	4:5	4:5	1:80
PG	1	1	1:80
UNI	1	1	1:40
Prevo	1	1	1:80
Fuso	1	1	1:80
SC	Valmis mix		

Lopulliset pitoisuudet PCR-reaktioissa olivat alukkeille 900nM ja koettimille 200 nM.

PCR syklien määrä oli 40 ja tulokset analysoitiin SDS 2.2 –ohjelmalla (Applied Biosystems, California, USA). Kvantitatiivisen PCR:n bakteeriDNA tulokset normalisoitiin kokonaisDNApitoisuuden (Nanodrop) mukaan.

## **2.5 Tietojenkäsittely**

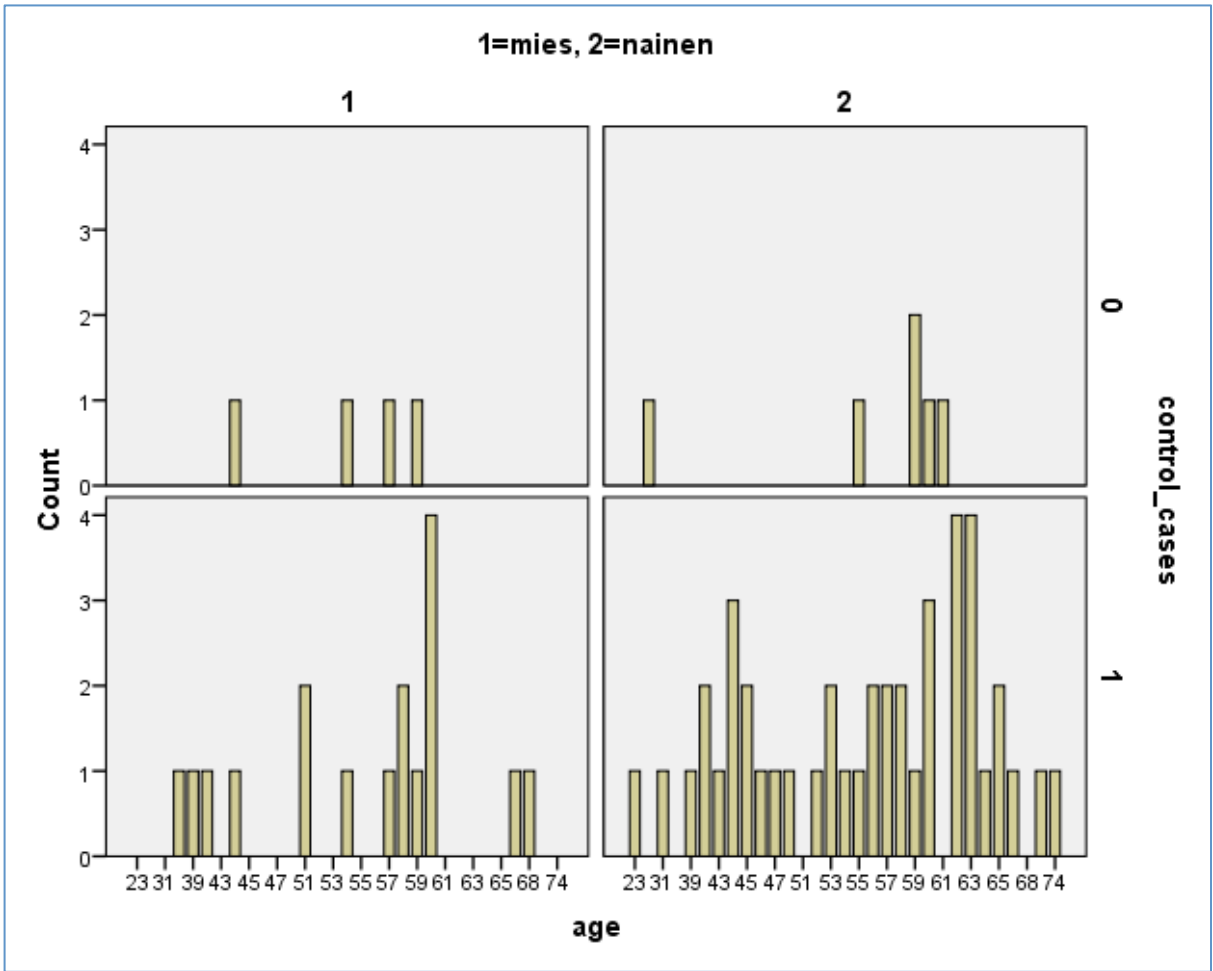
Bakteeripitoisuudet olivat vinosti jakautuneet, joten niistä tehtiin logaritminuutos. Fisherin exact, chi square, ANOVA, Kruskal Wallis ja Mann Whitney -testejä käytettiin laskemaan eroja eriryhmien kesken. Kaikki testit tehtiin SPSS-ohjelmalla, versio 23.2 (IBM SPSS Statistics for Windows; Armonk, NY: IBM Corp). P-arvo <0,05 pidettiin tilastollisesti merkitseväenä.

### 3 TULOKSET

#### 3.1 Arviointi

Aineisto koostui 64 potilaasta ja 10 kontrollitapauksesta, ikäjakauma ja sukupuolijakauma näkyvät allaolevasta kuvaajasta jaoteltuna erikseen kontrolleihin ja varsinaisiin tutkittaviin tapauksiin.

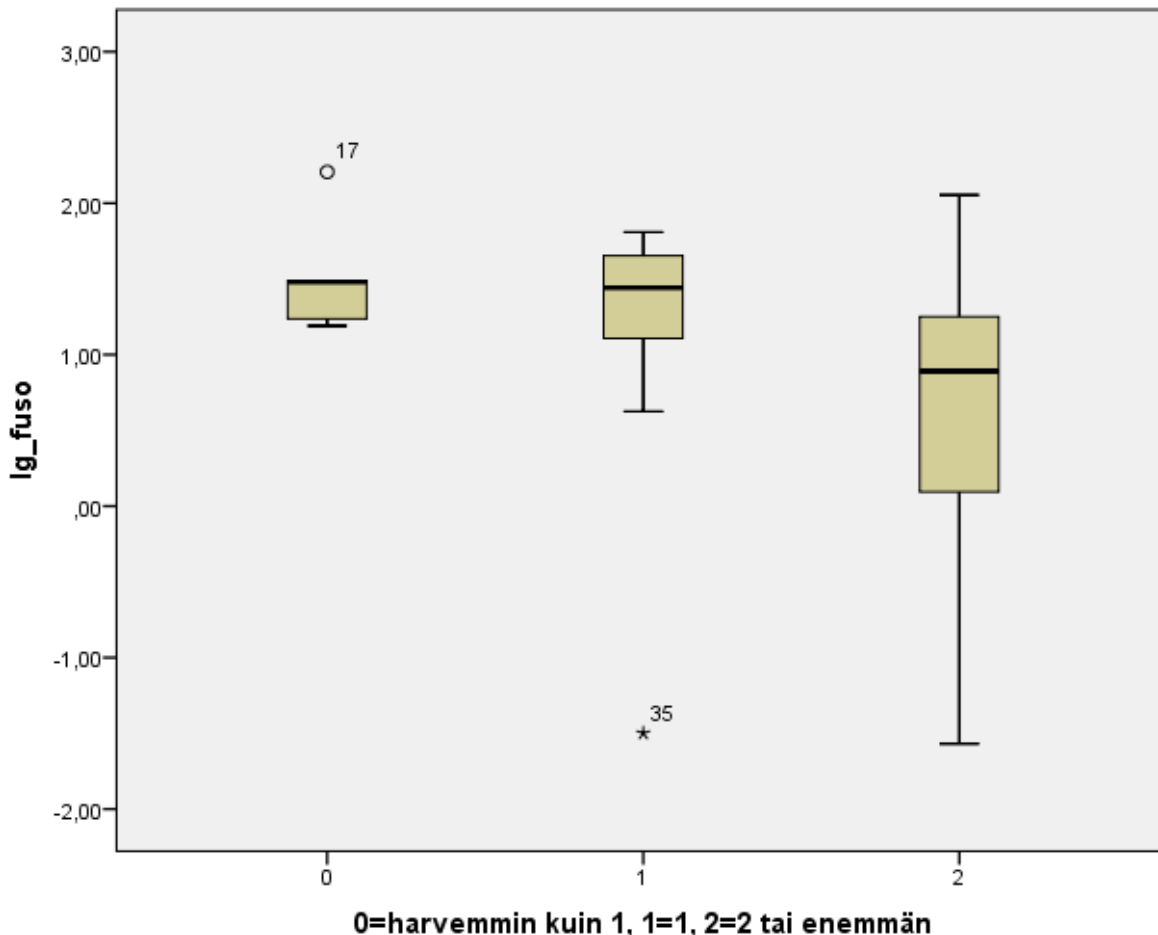
Taulukko 1. Tutkittavien ikä (age) ja sukupuolijakauma verrokeissa (control, 0) ja potilaissa(cases, 1). Count= määrä.



Streptokokkien ja fusobakteereiden määrät olivat naisilla matalammat kuin miehillä. *Streptococcus* -pitoisuus naisilla oli keskimäärin 2,20 ng/ml ja miehillä 3,80 ng/ml ( $p=0,049$ , Oneway ANOVA). *Fusobacterium*-pitoisuus oli naisilla keskimäärin 15,48 ng/ml ja miehillä 37,46 ng/ml ( $p=0,065$ , Oneway ANOVA). Myös kokonaisbakteeripitoisuus naisilla oli keskimäärin matalampi 107,42 ng/ml ja miehillä 183,90 ng/ml ( $p=0,037$ , Oneway ANOVA)

Potilasaineistossa vertasimme bakteeripitoisuuksia klinisiin hammasparametreihin. Hampaiden harjauskerrat luokiteltiin kolmeen eri luokkaan sen mukaan kuinka monta kertaa potilas harjasi hampaitaan oman arvionsa mukaan keskimäärin: 0= 0 kertaa päivässä tai vähemmän kuin 1 kertaa päivässä keskimäärin, 1= yhden kerran päivässä, 2= 2 tai useammin päivässä. *Fusobacterium*-pitoisuus erosi näissä ryhmissä siten, että kahdesti tai useammin harjaavilla oli keskimääräinen bakteeripitoisuus on 17,53 ng/ml merkittävästi pienempi ( $p=0,038$ , Oneway ANOVA) verrattaessa harvemmin kuin 1 kertaa päivässä harjaavilla tai yhden kerran päivässä harjaavien ryhmään (26,71 ng/ml).

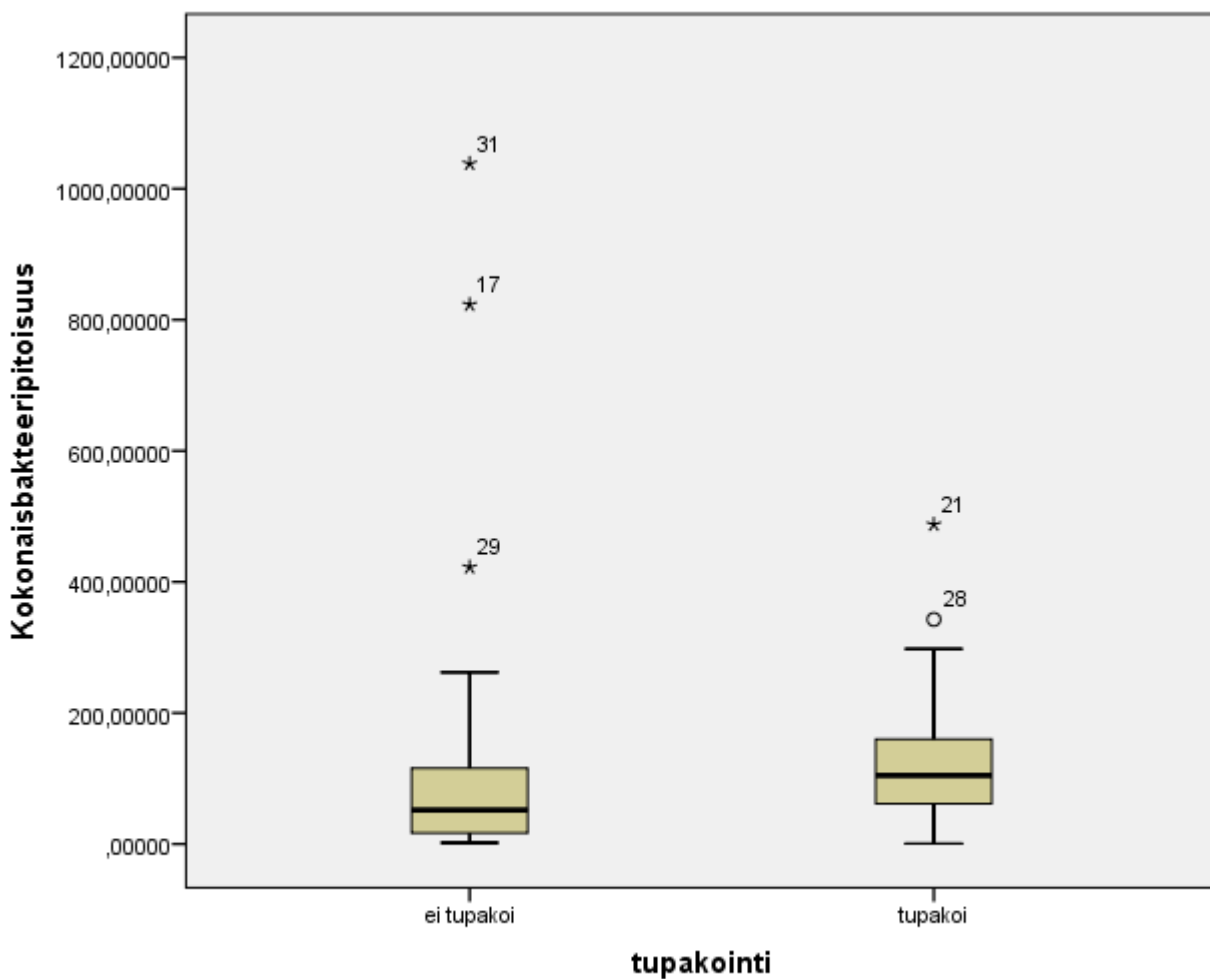
Taulukko 2. SAV-potilaiden hampaidenharjauskerrat jaoteltuna ja suhteutettuna logamitriseen *Fusobacterium*-pitoisuuteen (ng/ml). Potilaita, jotka harjasivat 0 kertaa hampaat päivässä oli 5, yhden kerran päivässä harjaavia 15 ja kaksi tai useammin harjaavia 40.



Infektioscoren eli tulehdustilannetta kuvaavan arvon ja fusobakteerien määrän välillä oli lähes merkitsevä yhteys ( $p=0,058$ , Oneway ANOVA). Lisäksi fusobakteerin pitoisuudet nousivat, mitä suurempi tulehdustilanne oli ja sen suhteen oliko 4-5 mm ientaskuja vai ei ( $p=0,001$ , Oneway ANOVA) ja oliko 6 mm tai suurempia ientaskuja ( $p=0,001$ , Oneway ANOVA). Niillä, joilla oli 4-5 mm ientaskuja keskimääräinen bakteeripitoisuus oli 26,76 ng/ml, kun taas niillä joilla ei ollut syviä ientaskuja bakteeripitoisuus oli 8,93 ng/ml. Potilailla, joilla oli 6 mm ientasku tai suurempi keskimääräinen bakteeripitoisuus taas oli 35,63 ng/ml, kun potilailla, joilla oli pienemmät ientaskut keskimääräinen pitoisuus oli 13,92 ng/ml. Muiden bakteereiden suhteen ei havaittu tilastollisesti merkitseviä eroja.

Tupakoimattomilla oli keskimäärin 137,23 ng/ml, kun taas tupakoitsijalla oli 128,12 ng/ml ( $p=0,039$ , Kruskal-Wallis -testi). Keskiarvoon tosin vaikutti yksittäiset tapaukset tupakoimattomien ryhmässä pitoisuutta nostavasti.

Taulukko 3. Tupakointi ja kokonaisbakteeripitoisuus. Tupakoimattomien ryhmässä on yksittäistapauksia, joilla kokonaisbakteeripitoisuus oli hyvin suuri verrattuna muihin tupakoimattomiin.



## 4 POHDINTA

Tämä tutkimus oli jatkotutkimus aikaisempiin vuosien 2013 ja 2016 tuloksiin (Pyysalo ym. 2013, 2016). Tutkimuksissa vuotaneiden ja vuotamattomien aivoaneurysmien seinämistä monistui PCR:n avulla oraalisten bakteerien DNA:ta ja tutkijat arvelivat, että puhkeamisen taustalla on hammasperäisten bakteerien aiheuttama tulehdusreaktio. DNA oli peräisin endodonttisista ja peridontaalisista bakteereista. Yoshioka on julkaissut 2016 tutkimuksen aiheesta, tässä tutkimuksessa on saatu näyttöä *Porphyromonas gingivalisen* olevan yhteydessä kallonsisäisten aneurysmien patofysiologiaan. Tässä tutkimuksessa keräsimme potilailta ientaskunäytteet ja heidän hampaiden kliininen kunto tutkittiin. Löysimme, että hampaiden infektioita kuvaavan parametrin ja fusobakteereiden määrän välillä oli lähes merkitsevä positiivinen korrelaatio. Lisäksi fusobakteereiden pitoisuudet nousivat, mitä syvempiä ientaskut olivat.

Reaaliaikainen kvantitatiivinen polymeraasiketjureaktio eli RT- q PCR on herkkä ja yksi tärkeimmistä molekyylibiologiassa käytetyistä tutkimusmenetelmistä. Sen avulla yksittäinen geeni voidaan monistaa PCR-laitteen, tiettyjen alukkeiden (R ja F) ja DNA-polymeraasin avulla. Kun näytteen DNA-pätkään tarttuu myös fluoresoiva koetin, voidaan monistettujen pätkien määrä mitata. Näin voidaan selvittää tiettyjen bakteeriDNA:iden olemassaolo ja määrä näytteessä. PCR on menetelmänä luotettavampi sen herkkyyden ja objektiivisuuden vuoksi verrattuna värjäykseen tai viljelymenetelmiin. Näin voidaan myös tutkia bakteeria, joka ei kasva viljelmissä sekä saadaan selvitettyä näytteen sisältämät kuolleet bakteerit, bakteerin osat ja kaikki bakteeriperäinen DNA. Lisäksi viljely ja värjäysmenetelmät ovat hitaita ja työläitä. Kustannustehokkuuskin on yksi kuvaava avainsana mietittäessä PCR-menetelmän käyttökelpoisuutta. Kuitenkin PCR on menetelmänä hyvin herkkä. Näytettä ottaessa ja sen jatkokäsittelyssä voi tapahtua kontaminaatiota näytteeseen, eli vierasta näytteeseen kuulumatonta bakteeriDNA:ta on voinut joutua näytteeseen ja täten PCR on voinut monistaa tämänkin DNA:n osuuden merkittäväksi herkkyytensä vuoksi.

Aineiston koko on suhteellisen pieni ja voidaan yleistää vain samankaltaiseen populaatioon luotettavasti. Näytteet on kerätty Tampereella potilaista, jotka ovat käyneet yliopistosairaalassa aikaisemmin aneurysmansa vuoksi. Etnisyydeltään näytteenantajat olivat kaukaasialaisia, ikäjakauma painottuu taas yli 50-vuotiaisiin. Suu on kuitenkin dynaaminen tila ja bakteeristo myös muuttuu mm elämäntapojen mukaan, saatavilla oleva ravinto ja antibioottikuurit mahdollisesti vaikuttavat tähän. Tutkimuksessa todettiin, että kaksi kertaa hampaansa harjaavilla oli pienemmät pitoisuudet bakteereita suussa, mutta olisi mielenkiintoista tietää miten tämä vaikuttaa pitoisuuksiin verenkierrossa systeemisesti, onko tulehdusta ja aneurysmia vähemmän? Entä hampaiden harjauksen yhteydessä tapahtuva mekaaninen vaurio ikenen pinnassa, onko tällä merkitystä bakteerien ja tulehduksen välittäjäaineiden pääsillä verenkiertoon?

Tutkimuksemme antaa viitteitä siitä, että hampaiden huolellinen hoito ja hyvä suuhygienia voi vaikuttaa myös aivojen verenkierron terveyteen. Koska muita tutkimustuloksia on hyvin vähän, tulokset täytyy toistaa suuremmassa aineistossa.



## 5 LÄHTEET

1. Jääskeläinen Juha E., 2016, Aivovaltimoaneurysma ja subaraknoidaalivuoto (SAV), Lääkärin käsikirja
2. Roine Susanna, Hannu Kalimo, 2012, Kallonsisäiset verenvuodot, Patologia, Duodecim
3. International Study of Unruptured Intracranial Aneurysms Investigators. "Unruptured intracranial aneurysms—risk of rupture and risks of surgical intervention." *N Engl J Med* 1998, no. 339 (1998): 1725-1733.
4. Rinkel, Gabriel JE, Mamuka Djibuti, Ale Algra, and J. Van Gijn. "Prevalence and risk of rupture of intracranial aneurysms a systematic review." *Stroke* 29, no. 1 (1998): 251-256.
5. Tulamo Riikka, Frösen Juhana, Laaksamo Elisa, Niemelä Mika Laakso Aki, Hernesniemi Juha, Miksi aivovaltimoaneurysma puhkeaa?, Katsaus, Lääketieteellinen Aikakausikirja Duodecim, 2011;127(3):244-52
6. David S Liebeskind, Helmi L Lutsep, Cerebral Aneurysms: Practice Essentials, Background, Pathophysiology, 2016, (Neurology, Medscape)
7. Wardlaw, J. M., and P. M. White. "The detection and management of unruptured intracranial aneurysms." *Brain* 123, no. 2 (2000): 205-221
8. Pertti Mustajoki, Tietoa potilaalle: Aivokalvon alainen verenvuoto (SAV), Lääkärikirja Duodecim, 2015
9. Korja, Miikka, Karri Silventoinen, Tiina Laatikainen, Pekka Jousilahti, Veikko Salomaa, Juha Hernesniemi, and Jaakko Kaprio. "Risk factors and their combined effects on the incidence rate of subarachnoid hemorrhage—a population-based cohort study." *PloS one* 8, no. 9 (2013): e73760.
10. Pyysalo, Mikko J., Liisa M. Pyysalo, Tanja Pessi, Pekka J. Karhunen, and Juha E. Öhman. "The connection between ruptured cerebral aneurysms and odontogenic bacteria." *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* (2013): jnnp-2012.
11. Park, Seong-Ho, Man-Bin Yim, Chang-Young Lee, Ealmaan Kim, and Eun-Ik Son. "Intracranial fusiform aneurysms: it's pathogenesis, clinical characteristics and managements." *Journal of Korean Neurosurgical Society* 44, no. 3 (2008): 116-123.
12. Mohan, D., V. Munteanu, T. Coman, and A. V. Ciurea. "Genetic factors involves in intracranial aneurysms—actualities." *Journal of medicine and life* 8, no. 3 (2015): 336.
13. Korja, Miikka, Karri Silventoinen, Peter McCarron, Slobodan Zdravkovic, Axel Skyttke, Arto Haapanen, Ulf de Faire et al. "Genetic epidemiology of spontaneous subarachnoid hemorrhage Nordic twin study." *Stroke* 41, no. 11 (2010): 2458-2462.
14. Omodaka, Shunsuke, Shin-ichirou Sugiyama, Takashi Inoue, Kenichi Funamoto, Miki Fujimura, Hiroaki Shimizu, Toshiyuki Hayase, Akira Takahashi, and Teiji Tominaga. "Local hemodynamics at the rupture point of cerebral aneurysms determined by computational fluid dynamics analysis." *Cerebrovascular Diseases* 34, no. 2 (2012): 121-129.
15. Roine Risto O., Juvela Seppo, Lukinkalvonalaisen verenvuodon eli subaraknoidaalivuodon diagnostiikka, Akuuttihoito-opas, 2015
16. Ajiboye, Norman, Nohra Chalouhi, Robert M. Starke, Mario Zanaty, and Rodney Bell. "Unruptured Cerebral Aneurysms: Evaluation and Management." *The Scientific World Journal* 2015 (2015).

17. Chen, Sheng, Qian Li, Haijian Wu, Paul R. Krafft, Zhen Wang, and John H. Zhang. "The harmful effects of subarachnoid hemorrhage on extracerebral organs." *BioMed research international* 2014 (2014).
18. Etminan, Nima, and Gabriel J. Rinkel. "Unruptured intracranial aneurysms: development, rupture and preventive management." *Nature Reviews Neurology* 12, no. 12 (2016): 699-713.
19. Ross, Michael H., and Wojciech Pawlina. *Histology*. Lippincott Williams & Wilkins, 2010.
20. Mäkinen Markus, Verisuonten kehitys ja rakenne, Patologia, Duodecim, 2012
21. Chalouhi, Nohra, Muhammad S. Ali, Pascal M. Jabbour, Stavropoula I. Tjoumakaris, L. Fernando Gonzalez, Robert H. Rosenwasser, Walter J. Koch, and Aaron S. Dumont. "Biology of intracranial aneurysms: role of inflammation." *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 32, no. 9 (2012): 1659-1676.
22. Frösen, Juhana. "Smooth muscle cells and the formation, degeneration, and rupture of saccular intracranial aneurysm wall—a review of current pathophysiological knowledge." *Translational stroke research* 5, no. 3 (2014): 347-356.
23. Pyysalo, Mikko J., Liisa M. Pyysalo, Tanja Pessi, Pekka J. Karhunen, Terho Lehtimäki, Niku Oksala, and Juha E. Öhman. "Bacterial DNA findings in ruptured and unruptured intracranial aneurysms." *Acta Odontologica Scandinavica* 74, no. 4 (2016): 315-320.
24. Iwai, Takehisa. "Periodontal bacteremia and various vascular diseases." *Journal of periodontal research* 44, no. 6 (2009): 689-694.
25. Klc, Türker, Mehran Sohrabifar, Özlem Kurtkaya, Özlem Yildirim, Ilhan Elmaci, Murat Günel, and M. Necmettin Pamir. "Expression of structural proteins and angiogenic factors in normal arterial and unruptured and ruptured aneurysm walls." *Neurosurgery* 57, no. 5 (2005): 997-1007.
26. Dhar, Sujana, Markus Tremmel, J. Mocco, Minsuok Kim, Junichi Yamamoto, Adnan H. Siddiqui, L. Nelson Hopkins, and Hui Meng. "Morphology parameters for intracranial aneurysm rupture risk assessment." *Neurosurgery* 63, no. 2 (2008): 185.
27. Pihlstrom, Bruce L., Bryan S. Michalowicz, and Newell W. Johnson. "Periodontal diseases." *The Lancet* 366, no. 9499 (2005): 1809-1820.
28. Aas, Jørn A., Bruce J. Paster, Lauren N. Stokes, Ingar Olsen, and Floyd E. Dewhirst. "Defining the normal bacterial flora of the oral cavity." *Journal of clinical microbiology* 43, no. 11 (2005): 5721-5732.
29. Dewhirst, Floyd E., Tuste Chen, Jacques Izard, Bruce J. Paster, Anne CR Tanner, Wen-Han Yu, Abirami Lakshmanan, and William G. Wade. "The human oral microbiome." *Journal of bacteriology* 192, no. 19 (2010): 5002-5017.
30. Pennisi, Elizabeth. "A mouthful of microbes." *Science* 307, no. 5717 (2005): 1899-1901.
31. Dominguez-Bello, Maria G., Elizabeth K. Costello, Monica Contreras, Magda Magris, Glida Hidalgo, Noah Fierer, and Rob Knight. "Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, no. 26 (2010): 11971-11975.
32. Könönen, E., S. Asikainen, and H. Jousimies-Somer. "The early colonization of gram-negative anaerobic bacteria in edentulous infants." *Oral microbiology and immunology* 7, no. 1 (1992): 28-31.
33. Kolenbrander, Paul E., Roxanna N. Andersen, David S. Blehert, Paul G. Egland, Jamie S. Foster, and Robert J. Palmer. "Communication among oral bacteria." *Microbiology and molecular biology reviews* 66, no. 3 (2002): 486-505.

34. Periasamy, Saravanan, and Paul E. Kolenbrander. "Central role of the early colonizer *Veillonella* sp. in establishing multispecies biofilm communities with initial, middle, and late colonizers of enamel." *Journal of bacteriology* 192, no. 12 (2010): 2965-2972.
35. Marsh, Philip D. "Role of the oral microflora in health." *Microbial Ecology in Health and Disease* 12, no. 3 (2000): 130-137.
36. Cortelli, Jose Roberto, Davi Romeiro Aquino, Sheila Cavalca Cortelli, Camila Borges Fernandes, Jonas de Carvalho-Filho, Gilson César Nobre Franco, Fernando Oliveira Costa, and Toshihisa Kawai. "Etiological analysis of initial colonization of periodontal pathogens in oral cavity." *Journal of clinical microbiology* 46, no. 4 (2008): 1322-1329.
37. Huang, Tung-Tsun, Tien-Chen Liu, Peir-Rong Chen, Fen-Yu Tseng, Te-Huei Yeh, and Yuh-Shyang Chen. "Deep neck infection: analysis of 185 cases." *Head & neck* 26, no. 10 (2004): 854-860.
38. Eija Könönen, Mervi Gürsoy, Parodontiitin patogeenien esiintyminen suun mikrobistossa ja vaikutus parodontaalikudoksiin, 2016, näytönastekatsaus, Duodecim
39. Pöllänen, Marja T., Jukka I. Salonen, and Veli-Jukka Uitto. "Structure and function of the tooth–epithelial interface in health and disease." *Periodontology 2000* 31, no. 1 (2003): 12-31.
40. Yoshioka, Shotaro. "Abstract TP85: Impact of Periodontal Disease and-Bacteria on Intracranial Aneurysms." *Stroke* 47, no. Suppl 1 (2016): ATP85-ATP85.